茶の残留農薬の一斉分析法

（１）適用範囲

茶（抹茶を除く）に適用する。

（２）分析対象農薬

１）有機塩素系農薬

BHC（α，β，γ，δの総和），DDT（DDD，DDE を含む），エンドスルファン（α，β及びスルファートの総和），エンドリン及びハルフェンプロックスの５農薬

２）有機リン系農薬

EPN，IBP，エチオン，クロルピリホス，クロルフェンビンホス，シアノフェンホス，ジメトエート，ダイアジノン，パラチオン，パラチオンメチル，ピリミホスメチル，フェニトロチオン（MEP），フェントエート（PAP）及びプロチオホスの１４農薬

３）カーバメイト系農薬

BPMC 及び XMC の２農薬

４）ピレスロイド系農薬

シフルトリン，シペルメトリン，トラロメトリン，フェンバレレート，フルバリネート及びペルメトリンの６農薬

５）含窒素系農薬

テブフェンピラド，トリフルラリン及びピリダベンの３農薬

６）その他の農薬

イプロジオン（代謝物を含む），エトフェンプロックス，クロフェンテジン，クロルフルアズロン，ジフェノコナゾール，ジフルベンズロン，テブフェノジド，テフルベンズロン，ピリフェノックス（E 及び Z の総和），ピレトリン，フェンピロキシメート，フルフェノクスロン，ヘキサフルムロン，ヘキシチアゾクス及びミクロブタニルの１５農薬

（３）装置

電子捕獲型検出器（ECD），リン用干渉フィルター付き炎光光度型検出器（FPD）及び高感度窒素・リン検出器（NPD）を装備したガスクロマトグラフ（GC）及びフォトダイオードアレイ検出器（PDA）付き高速液体クロマトグラフ（HPLC）を用いる。

（４）試薬

１）アセトン：残留農薬試験用

２）n- ヘキサン：残留農薬試験用

３）アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用

４）トルエン：：残留農薬試験用

５）酢酸エチル：残留農薬試験用

６）メタノール：：残留農薬試験用

７）50 %酢酸エチル含有ヘキサン：酢酸エチルと n-ヘキサンを 50：50（v/v）の割合で混合する。

8）30 %トルエン含有酢酸エチル：トルエンと酢酸エチルを 30：70（v/v）の割合で混合する。
9）粉末セルロース：カラムクロマトグラフィー用の微結晶性粉末セルロース[1)]
10）無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用
11）固相抽出用 ODS カラム：5g の ODS が充填されたもの[2)]
12）ミニカラム：ENVI-Carb/LC-NH_2 500mg/500mg（スペルコ社）

（5）標準溶液の調製[3)]

1）有機塩素系及びピレスロイド系農薬

上記の分析対象農薬の標準品を用意する。ただし，BHC についてはα-BHC，β-BHC，γ-BHC 及びδ-BHC を，DDT については p,p'-DDT，p,p'-DDD 及び p,p'-DDE を，エンドスルファンについてはα体，β体及びエンドスルファンスルファートをそれぞれ用意する。これらをそれぞれ，アセトンに溶解して 1000ppm の個別の標準溶液を調製し，さらに適宜混合・希釈して測定用混合標準溶液を調製する。

2）有機リン系農薬

上記の分析対象農薬の標準品を用意する。これらをそれぞれアセトンに溶解して 1000ppm の個別の標準溶液を調製し，さらに適宜混合・希釈して測定用混合標準溶液を調製する。

3）カーバメイト系及び含窒素系農薬

上記の分析対象農薬の標準品を用意する。これらをそれぞれアセトンに溶解して 1000ppm の個別の標準溶液を調製し，さらに適宜混合・希釈して測定用混合標準溶液を調製する。

4）その他の農薬

上記の分析対象農薬の標準品を用意する。ただし，イプロジオンについてはイプロジオン及びイプロジオン代謝物を，ピリフェノックスについては E 体及び Z 体を用意する。これらをそれぞれアセトニトリルに溶解して 1000ppm の個別の標準溶液を調製し，さらに適宜混合・希釈して測定用混合標準溶液[4)]を調製する。

（6）試験溶液の調製

1）熱湯による抽出

茶葉 9.00 g を 1 L 容のビーカーに秤りとり，これに 540ml の沸騰水を加え，5 分間浸出する。あらかじめ No.5C のろ紙を密着させ，ろ過助剤として粉末セルロースを 1cm 程度の厚さに敷いた桐山ロートで浸出液を減圧ろ過し[5)]，ろ液は 1 L 容のトールビーカーにとり，直ちに氷水中で冷却する。

2）固相抽出及びクリーンアップ

吸引装置に取り付けた固相抽出用 ODS カラムに，メタノール 30ml，続いて純水 30ml を通過させ，コンディショニングを行う。これに抽出液 360ml を 10ml/分以下の流速で負荷する。カラムは純水 30ml で洗浄し，さらに余分な水分を除去するために約 2 ～ 3 分間通気させた後，50 %酢酸エチル含有ヘキサン 50ml で溶出させる。溶出液を無水硫酸ナトリウム（下層）40g 及び粉末セルロース 2g（上層）を充填したカラム（内径 20mm，長さ 30cm）を用いて脱水する。カラムを 50 %酢酸エチル含有ヘキサン 30ml で洗浄し，洗液を通過液と合わせた後，40 ℃以下で減圧濃縮し，さらに窒素気流下でこれを乾固[6)]した後，30 %トルエン含有酢酸エチル 2 ml に溶解させる。

これを，あらかじめ 30 %トルエン含有酢酸エチル 10ml でコンディショニングしたミニカラムに負荷し，30 %トルエン含有酢酸エチル 25ml で溶出させる。溶出液を 40 ℃以下で減圧濃

縮し，さらに窒素気流下でこれを乾固する。これをアセトン２ ml に溶解[7)]させて試験液Ａとし，さらにこれから 1ml を分取して窒素気流下で乾固し，アセトニトリル 1ml に溶解させたものを試験液Ｂとする。試験液Ａは GC 用として，有機塩素系，有機リン系，カーバメイト系，ピレスロイド系及び含窒素系農薬の分析に用いる。試験液Ｂは HPLC 用として，その他の農薬の分析に用いる。

（７）ガスクロマトグラフィー

GC 分析を行う農薬については，それぞれの系統別に以下の条件[8)]を参考にして目的ピークが良好に溶出するように諸条件を調整する。

定量は，各成分ごとに標準溶液の濃度に対してピーク高さをプロットして検量線を作成し，絶対検量線法により各成分の濃度を求める[9)]。多成分からなる農薬のうち，BHC，DDT，エンドスルファンについては，その異性体，代謝物のそれぞれについて定量し，その総和を算出する。また，定量対象農薬がいくつかの異性体等の混合物であり，その農薬の標準物質においてそれぞれの異性体等の含有量が不明である場合には，試料，標準の双方において各異性体のピーク高さの合計値を求め，それによって検量線から濃度を算出する[10)]。

確認試験については，極性の異なる３種類のカラム[11)]を用いて GC 分析を実施し，すべてにおいて標準品と保持時間の一致したピークが得られた場合にその農薬と同定する。更に３種類のカラムによる定量値の平均値を算出して最終的な測定値とする[12)]。ただし，これらの測定値が大きく異なる場合にはその原因を特定して解決し，類似した数値が得られてから平均値を算出する。

（GC 条件例）

１）有機塩素系及びピレスロイド系農薬

カラム：DB-5（J&W 社），内径 0.25mm × 30m，膜厚 0.25μm
検出器：電子捕獲型検出器（ECD）
試料注入口温度：260 ℃
検出器温度：280 ℃
カラム恒温槽温度：初期温度 50 ℃で 2 分間保持し，10 ℃/min で 150 ℃まで昇温する。その後 2.5 ℃/min で 210 ℃まで，さらに 5 ℃/min で 240 ℃まで昇温し，最後のピークが溶出するまで保持する。
キャリアーガス及び流量：ヘリウム，2 〜 5ml/min
メイクアップガス：超高純度窒素
注入方式：スプリットレス
注入量：1 μl

２）有機リン系農薬

カラム：DB-1（J&W 社），内径 0.25mm × 30m，膜厚 0.25μm
検出器：リン用干渉フィルター付き炎光光度型検出器（FPD）
試料注入口温度：200 ℃
検出器温度：250 ℃
カラム恒温槽温度：初期温度 60 ℃で 2 分間保持し，20 ℃/min で 160 ℃まで昇温する。1 分間保持した後，5 ℃/min で 200 ℃まで昇温し，次いで 2 ℃/min で 220 ℃まで，さらに 5 ℃/min で 240 ℃まで昇温し，最後のピークが溶出するまで保持する。
キャリアーガス及び流量：ヘリウム，2 〜 5ml/min
メイクアップガス：超高純度窒素

フレームガス：水素及び空気
注入方式：スプリットレス
注入量：1 µl

３）カーバメイト系及び含窒素系農薬
カラム：DB-5（J&W 社），内径 0.25mm × 30m，膜厚 0.25µm
検出器：高感度窒素・リン検出器（NPD）
試料注入口温度：240 ℃
検出器温度：280 ℃
カラム恒温槽温度：初期温度 50 ℃で 2 分間保持し，20 ℃/min で 210 ℃まで昇温する。その後 5 ℃/min で 250 ℃まで昇温し，最後のピークが溶出するまで保持する。
キャリアーガス及び流量：ヘリウム，2 〜 5ml/min
メイクアップガス：超高純度窒素
サポートガス：水素及び空気
注入方式：スプリットレス
注入量：1 µl

（８）高速液体クロマトグラフィー
その他の農薬については，以下の条件を参考に PDA 付き HPLC により分析を行う。その際，各ピークの溶出状態を勘案し，目的ピークが良好に溶出するように諸条件を調整する。
定量は，以下に示す波長のクロマトグラムにおいて，各成分ごとに標準溶液の濃度に対してピーク面積またはピーク高さをプロットして検量線を作成し，絶対検量線法により試料中の各成分の濃度を求める。ピリフェノックスについては，異性体のそれぞれについて定量し，その総和を算出する。
確認試験は，保持時間及び UV スペクトルを参照して行う。

（HPLC 条件例）

カラム：シリカゲル ODS（内径 4.6mm，長さ 150mm 程度）
検出器：フォトダイオードアレイ検出器（210 〜 350nm）
移動相：　A：　0.01M KH_2PO_4 －アセトニトリル（70：30）
　　　　　B：　0.01M KH_2PO_4 －アセトニトリル（20：80）
グラジエント条件：

	0 分	40 分	50 分
A 液	100	0	0
B 液	0	100	100

カラム温度：40 ℃
注入量：20 µl
定量波長：260nm（ジフルベンズロン，クロフェンテジン，クロルフルアズロン，フェンピロキシメート，フルフェノクスロン，ヘキサフルムロン）
230nm（それ以外の HPLC 測定対象農薬）

注１）アビセル（Merk 社）等がこれにあたる。薄層クロマトグラフィー用のものは使用できない。

注２）バリアン社製メガボンドエルート C18（5g 充填）またはこれと同等のもの。5g 以下の充填のものではオーバーロードの可能性がある。

注３）各標準品の純度を確認し，それを考慮して標準溶液を調製する。なお，多成分の同時分析なので，標準溶液のガスクロマトグラフィーにおいてピークが重複する場合があるが，そのときは標準溶液をいくつかに分ける等の対策を取る。

注４）これらの農薬のすべてを含む混合標準溶液を調製するとピークが重なるので，通常は以下の２グループに分けるとよい。

Ａグループ：イプロジオン（イプロジオン代謝物を含む），エトフェンプロックス，ジフルベンズロン，テフルベンズロン，ピレトリン，フェンピロキシメート，ヘキシチアゾクス

Ｂグループ：クロフェンテジン，クロルフルアズロン，ジフェノコナゾール，テブフェノジド，ピリフェノックス（E 型及び Z 型），フルフェノクスロン，ヘキサフルムロン

注５）No.5A のろ紙では，その後に使用する ODS カラムが詰まることがある。また，真空度が上がりやすくなるため，ろ過鐘内で沸騰させないように注意する。

注６）乾固する際に一部の農薬が損失することがあるので，窒素気流を強く吹き付けないようにし，器壁が完全に乾燥する直前にこれを止めるようにする。以下，乾固の際には同様に操作する。

注７）容器を冷却し，容器の口をパラフィルムで覆う等，溶媒の蒸発を防止するよう留意する。以下，一定量の溶媒に溶解させる際には同様に操作する。

注８）各成分の溶出位置は諸条件により変動するので，ガスクロマトグラフの分析条件は適宜検討し，目的ピークが良好に溶出するように諸条件を調整して分析を行う。また，カラム及び検出器の使用温度の上限にも留意する。各種ガスの流量は取扱説明書等を参考に設定するが，一般にキャリアガスは線速度が 30cm 程度に設定すると分離がよい。

注９）抽出試料と標準試料のマトリックスの違いにより，標準試料に比べて抽出試料における農薬の感度が高くなり，見掛け上異常に回収率が上昇する場合がある。回収試験の結果このような現象が見られた場合には，標準添加法等のマトリックスの影響を相殺できる方法を採用する。

注10）多くのピレスロイド系農薬には異性体等が存在し，複数のピークが出現することが多い。これらについてはそれぞれの異性体等の単品を入手することは難しいので，試料，標準品の双方で各異性体のピーク高さの和を算出し，これをもって定量を行う。

注11）J&W 社製 DB-1，DB-5，DB-1301，DB-1701，DB-210，DB-17 またはその他のメーカーの製品の中から適当なものを選択する。３種類のカラムを用いる代わりにガスクロマトグラフ質量分析計で確認試験を行ってもよいが，質量検出器は ECD 等に比べて感度が低くなる場合があるので，この点を考慮して測定に十分な感度があることを確認しておくこと。